



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ ⑫ **Offenlegungsschrift**
⑯ **DE 199 35 204 A 1**

⑯ Int. Cl.⁷:
C 07 B 51/00
C 07 B 61/00
C 07 H 21/00

⑯ Anmelder:
Bemauer, Annette, 79249 Merzhausen, DE

⑯ Erfinder:
Pfleiderer, Wolfgang, 78464 Konstanz, DE

⑯ Aktenzeichen: 199 35 204.6
⑯ Anmeldetag: 27. 7. 1999
⑯ Offenlegungstag: 1. 2. 2001

DE 199 35 204 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Maskierung und Markierung von unvollständigen Produkten bei der Synthese von Oligo-Nukleotiden zur nachfolgenden Trennung

DE 199 35 204 A 1

Beschreibung

Die chemische Synthese von vollständigen OLIGO-Nukleotiden (n-Produkte) ist in jedem der Synthesezyklen (m) bei der Additionsreaktion der Amiditverbindungen nicht ganz vollständig. Es reichern sich Produkte unvollständiger Sequenz (n-1 bis n-d Produkte, d = Einbasendeletionen, d = 1 bis n-1) an. Die Vollständigkeit der Additionsreaktion variiert mit der Einstellung optimaler Reaktionsbedingungen und entspricht dem technischen Stand den modernen Synthesemaschinen erreichen. Sie liegt bei ca. 98-99,9%. Dies bedeutet, daß zu einem geringen Prozentsatz bei jedem Syntheseschritt (m) m-1-Produkte entstehen können, die eine Einbasendeletion (d) tragen, sofern im nächsten Syntheseschritt an dieselbe Position des OLIGO-Nukleotids wieder eine Additionsreaktion erfolgt.

Bei der Synthese eines 100 mers sind bei 99% Einbauwahrscheinlichkeit schließlich nur noch 37% der OLIGOs n-Produkte mit der vollständigen Sequenz. Der Rest sind n-d-Produkte deren Deletion an verschiedenen Positionen der OLIGO-Sequenz liegen. Diese können in nachfolgenden Reaktionen Fehler verursachen, der sich je nach der verwendeten Methodik mehr oder weniger stark auswirken.

Besonders bei der Gensynthese (Geneassembly, dsDNA-Synthese) aus OLIGO-Nukleotiden sind meist Einzelnukleotiddeletionen die Ursache für fehlerhafte Sequenzen.

Um vollständige n-Produkte von unvollständigen n-d-Produkten zu trennen und fehlerhafte Sequenzen auszuschließen wurde das hier beschriebene Verfahren entwickelt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren das nach der gerichteten Synthese sequenzvordeterminierter Polymere und Mischpolymere die Trennung von vollständigen und unvollständigen Syntheseprodukten erlaubt. Hierzu werden in jedem Synthesezyklus (m, m = 1 bis n-1) die von Schutzgruppen befreiten chemischen Zielfunktionen, welche nicht mit den in jedem neuen Synthesezyklus (m = m+1) zugeführten Monomeren reagiert haben mit einer weiteren reaktiven Molekülspezies modifiziert. Handelt es sich bei der weiteren Molekülspezies um ein mindestens bifunktionales Molekül, das zum einen die freien Gruppen effizient maskiert, zum anderen aber eine geeignete Funktion besitzt zur anschließenden Durchführung eines Trennungsverfahrens, der so modifizierten Moleküle, so wurden diese für ein geeignetes Trennungsverfahren markiert.

In der weiteren Darstellung wurde beispielhaft die Synthese von OLIGO-Nukleotiden gewählt.

Nach dem heutigen Stand der Technik werden OLIGO-Nukleotide von einem an CPG (=controlled pore size glass) Kägelchen oder einer anderen geeigneten Synthesematrix am 3'-Ende gebundenen Startermolekül aus synthetisiert und die Addition der Phosphitamidomonomere erfolgt in 3'-5'-Richtung. Die Synthese in der umgekehrten Richtung ist ebenfalls möglich, wird aber in der Praxis selten durchgeführt. Das beschriebene Verfahren zur Vermeidung von n-d-Produkten bei der Synthese von Oligonukleotiden kann in beiden Syntheserichtungen durchgeführt werden, wobei die Additionsreaktion einer bifunktionalen Molekülspezies dann jeweils auf das freie 5'-Hydroxende oder das freie 3'-Hydroxyende erfolgt.

Um n-2 bis n-d-Produkte (n > d) zu unterdrücken werden in der Regel nach dem heutigen Stand der Technik in einer nachgeschalteten Additionsreaktion die n-1-Produkte durch das sehr reaktive Acetoanhydrid am 5'-Ende (bei der 3'-5'-Synthese) maskiert (für die 5'-3'-Synthese das 3'-Ende), so daß diese bei nachfolgenden Additionsreaktionen mit Amiditverbindungen nicht mehr als Reaktanten zur Verfügung stehen. Es entstehen in verschiedenen Synthesezyklen nur

m-1-Produkte.

In dem hier beschriebenen Verfahren wird die Maskierungsreaktion wie sie oben für Acetoanhydrid beschrieben wurde durch mindestens eine mindestens bifunktionale hochreaktive Molekülspezies ersetzt, die mindestens eine chemisch hochreaktive Gruppe für die 5'-OH-Funktion des nicht gekoppelten Nukleotids und am anderen Ende mindestens eine chemische Gruppe (chemische Funktion oder Struktur) trägt, die

8. eine hohe Affinität zu einer anderen (Makro-)molekülspezies aufweist, wie z. B. Biotin, oder
 9. eine bis mehrere zur 5'- bzw. 3'-hydroxyspezifischen Maskierungsreaktion unterschiedliche (hoch-)reaktive funktionale chemische Gruppe(-n) trägt, die eine Addition an eine auf die Reaktion mit dieser(n) Gruppe(n) optimierte, u. U. modifizierte Oberfläche ermöglicht (z. B. eine Cycloaddition nach dem Diels Aldertyp).

Durch die Reaktion(en) mit dieser(n) Molekülspezies wird nach jedem Additionszyklus (m) ein entstehendes m-1 Produkt am 5'-Ende der matrixgebundenen OLIGO-Sequenz durch eine zusätzliche Reaktion mit einer mindestens bifunktionalen Molekülspezies chemisch markiert und gleichzeitig markiert (z. B. nach Fig. 1, mit einer Biotinfunktion).

Über eine Affinitätsmatrix (z. B. Streptavidinmatrix) oder eine mit der/den chemischen Strukturen oder Funktion(en) der Markierung reagierenden Matrix können dann nach der Trennung der OLIGO-Nukleotide von der Synthesematrix unvollständige Syntheseprodukte aus der Lösung entfernt werden.

In einer vorteilhaften Ausführungsform des hier beschriebenen Verfahrens werden die, durch die Maskierungsreaktion biotinmarkierten, unvollständigen Syntheseprodukte über eine Affinitätsäule (z. B. Streptavittinsäulen) gegeben. Im Eluat finden sich dann die vollständigen n-Produkte.

In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform werden, wie oben beschrieben, markierte OLIGO-Nukleotide direkt in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (z. B. von Roche) pipettiert. Unvollständige Produkte werden dann an der Wand der Kavitäten gebunden. In Lösung befinden sich dann alle n-Produkte mit der vollen Länge der Sequenz.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführung beispielsweise ist die Affinitätsmatrix, an welche die markierten unvollständigen Produkte binden können, auf Metall oder Magnetkugelchen aufgebracht, an die die markierten unvollständigen Produkte binden können. Die Trennung erfolgt dann mittels Magneten (System der Firma Dynal).

In weiteren vorteilhaften Ausführungen finden sich chemische Gruppen im markierenden bi- bis oligofunktionalen Molekül, die keine Additionsreaktion an das freie 5'- bzw. 3'-Ende der OLIGO-Kette eingehen, die aber einen anderen Typus einer hochreaktiven Addition an eine reaktionsunterstützende u. U. modifizierte Matrix darstellen. Dieser Reaktionstypus muß kompatibel mit allen Reaktionen sein, welche zyklisch in allen Syntheseschritten bei der OLIGO-Synthese ablaufen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Maskierung und Markierung von unvollständigen Produkten bei der Synthese von Polymeren und Mischpolymeren vorbestimmter Sequenz mit dem Ziel unvollständige (m-1) von vollständigen n-Syntheseprodukten (m = n) zu trennen. Das Verfahren

umfasst folgende Schritte:

- (a) Bereitstellung einer geeigneten Trägermatrix für die Initiation einer gerichteten Synthese oder einem geeigneten Initiatormolekül bei einer Synthese in Lösung
- (b) Addition eines geeigneten Monomers ($m = 1$) gegebenenfalls mit einer oder mehreren selektiv unter spezifischen (chemischen und/oder enzymatischen Bedingungen) und/oder physikalisch abspaltbaren Schutzgruppen, wobei unter physikalisch Strahlung, Temperaturänderung etc. zu verstehen ist.
- (c) mindestens ein weiterer, für die Synthese erforderlicher Reaktionsschritt
- (d) gegebenenfalls selektive Abspaltung der für die weitere Synthese mindestens einen notwendigen Schutzgruppe
- (e) Addition eines geeigneten Monomers ($m = m+1$) mit einer oder mehreren selektiv unter spezifischen (chemischen, und/oder enzymatischen Bedingungen), und/oder physikalisch abspaltbaren Schutzgruppen, wobei unter physikalisch Strahlung, Temperaturänderung etc. zu verstehen ist.
- (f) Addition mindestens einer bi- bis oligofunktionalen chemischen Verbindung, die einerseits effektiv, selektiv und irreversibel die freien, unreagierten, von Schutzgruppen befreiten chemischen Funktionen der $m-1$ -Moleküle ($m = m-1$) aus (e) und gegebenenfalls aus (a) maskiert und markiert, andererseits mit einer beliebigen aber definierten Matrix in eine stabile Wechselwirkung treten oder zu einer kovalenten Bindung reagieren kann
- (g) mindestens ein weiterer, für die Synthese erforderlicher Reaktionsschritt
- (h) gegebenenfalls Austausch der Reihenfolge der Syntheseschritte (g) nach (f) und (f) nach (g)
- (i) mindestens ein- gegebenenfalls mehrmalige Wiederholung der Schritte (d) bis (h) $n-1$ mal bis zum Erreichen des gewünschten n -Produkts ($m = 2$ bis n)
- (j) gegebenenfalls Abspaltung der Syntheseprodukte von der Synthesematrix durch geeignete Bedingungen oder Abspaltung des Initiatormoleküls, und gegebenenfalls Abspaltung geeigneter Schutzgruppen unter den gleichen Bedingungen
- (k) Trennung der vollständigen n -Syntheseprodukte von den unvollständigen, maskierten und markierten Syntheseprodukten ($m-1$) an einer geeigneten Matrix mittels der chemischen Strukturen oder Funktionen, welche durch die, in die unvollständigen Syntheseprodukte mittels des beschriebenen Verfahrens eingebauten, mindestens einen bi- bis oligofunktionalen Molekülspezies zur Verfügung gestellt wird
- (l) gegebenenfalls selektive Abspaltung weiterer, nicht syntheserelevanter Schutzgruppen nach den Schritten (j) bis (k).

2. Verfahren nach (1.) zur Maskierung und Markierung von unvollständigen Produkten bei der Synthese von OLIGO-Nukleotiden und abgeleiteten Mischpolymeren mit dem Ziel unvollständige von vollständigen Syntheseprodukten zu trennen. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- (a) Bereitstellung einer geeigneten Trägermatrix für die Initiation einer gerichteten (z. B. OLIGO-Nukleotidsynthese) oder eines entsprechenden In-

itiatormoleküs bei der Synthese in Lösung

- (b) Addition mindestens einer Phosphitamiditverbindung mit selektiv unter spezifischen chemischen Bedingungen und/oder physikalisch abspaltbaren Schutzgruppen, wobei unter physikalisch Strahlung, Temperaturänderung etc. zu verstehen ist.
- (c) gegebenenfalls Oxidation des Phosphitadukts von der Oxidationsstufe $III \rightarrow V$ zum Phosphat
- (d) Abspaltung der (z. B. am 5'- bzw. 3'-Hydroxyende befindlichen) Schutzgruppe(n) (z. B. zur freien Hydroxygruppe)
- (e) Addition einer Phosphitamiditverbindung mit selektiv unter spezifischen chemischen Bedingungen und/oder physikalisch abspaltbaren Schutzgruppen, wobei unter physikalisch Strahlung, Temperaturänderung etc. zu verstehen ist
- (f) Addition mindestens einer bi- bis oligofunktionalen chemischen Verbindung, die einerseits effektiv, selektiv und irreversibel die freien unreagierten Hydroxygruppen aus (e) und gegebenenfalls aus (a) maskiert und markiert, andererseits mit einer oder mehreren unterschiedlichen, aber definierten Matrix(es) in stabile Wechselwirkung treten kann oder mit dieser zu einer kovalenten Verbindung reagiert
- (g) gegebenenfalls Oxidation des Phosphitadukts von der Oxidationsstufe $III \rightarrow V$ zum Phosphat
- (h) gegebenenfalls Austausch der Reihenfolge der Reaktionsschritte (f) nach (g) und. (g) nach (f)
- (i) mindestens ein- gegebenenfalls mehrmalige Wiederholung der Schritte (d) bis (g) $m-1$ mal bis zum letzten Syntheseschritt d. h. zum Erreichen des gewünschten n -Produkts
- (j) gegebenenfalls Abspaltung der Syntheseprodukte der (z. B. OLIGO-Nukleotidsynthese) von der Synthesematrix durch geeignete Bedingungen, und gegebenenfalls die Abspaltung geeigneter Schutzgruppen unter den gleichen Bedingungen
- (k) Trennung der vollständigen n -Syntheseprodukte von den unvollständigen, maskierten und markierten Syntheseprodukten an einer geeigneten Matrix mittels der chemischen Struktur oder Funktion, welche durch die in die unvollständigen Syntheseprodukte durch das beschriebene Verfahren mindestens eine eingebaute bi- bis oligofunktionale Molekülspezies zur Verfügung gestellt wird
- (l) gegebenenfalls selektive Abspaltung weiterer, nicht syntheserelevanter Schutzgruppen nach den Schritten (j) bis (k).
- 3. Verfahren nach 1. und 2. wobei die Syntheserichtung formal in jeweils die eine oder in die andere Syntheserichtung erfolgen kann.
- 4. Verfahren nach 1. und 2., wobei die Syntheserichtung formal in 3'-5'-Richtung erfolgen kann.
- 5. Verfahren nach 1. und 2., wobei die Syntheserichtung formal in 5'-3'-Richtung erfolgen kann.
- 6. Verfahren nach 1. und 2., wobei die zur Synthese verwendeten Monomere formal den Strukturen in Fig. 2 entspricht.
- 7. Verfahren nach 1. und 2., wobei die zur Synthese verwendeten Monomere beliebige synthesetaugliche chemische Strukturen und deren Derivate sind, mit mindestens einem Paar miteinander reagierenden, che-

mischen Funktionen und deren Schutzgruppe(n).

8. Verfahren nach 1., wobei das erste Monomer der Sequenz der entstehenden Syntheseprodukte bereits matrixgebunden ist und gleichzeitig das Initiatormolekül für die weiteren Syntheseschritte darstellt. 5

9. Verfahren nach 1. und 2., wobei die zur Synthese verwendeten Monomere Phosphitamidite oder Phosphonate und deren Derivate sind, mit mindestens einer mit Phosphitamiditen oder Phosphonaten reagierenden chemischen Funktion und deren Schutzgruppe(n). 10

10. Verfahren nach 1. und 2., wobei die zur Synthese verwendeten Monomere desoxyNukleotidamidite und deren Derivate sind. 15

11. Verfahren nach 1. und 2., wobei die zur Synthese verwendeten Monomere riboNukleotidamidite und deren Derivate sind. 15

12. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mit den freien Hydroxygruppen reagierende chemische Funktion ein 5'- oder 3'-trityliertes, biotinyliertes Didesoxynukleotid sein kann. 20

13. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit den freien Hydroxygruppen reagierende chemische Funktion Maleinsäureanhydrit sein kann.

14. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit den freien Hydroxygruppen reaktive chemische Funktion ein Säurehalogenid z. B. ein Säurechlorid sein kann. 25

15. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit der Matrix reagierende chemische Gruppe eine chemische Struktur darstellt, die eine stabile affinitätsvermittelte Wechselwirkung eingeht. 30

16. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit der Matrix reagierende chemische Funktion eine stabile chemische Reaktion eingeht, die zur kovalenten Kopplung des Syntheseprodukts führt (z. B. geeignete Additionsreaktion, Cyloaddition, etc.). 35

17. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit der Matrix reagierende chemische Funktion eine stabile ionische oder Lewis Säure: Base-Wechselwirkung eingeht. 40

18. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mindestens eine, mit der Matrix interagierende chemische Struktur eine stabile Wechselwirkung mit matrixgebundenen Metallionen eingeht.

19. Verfahren nach 1. und 2., wobei das mindestens eine am m-1-Produkt gebundene Metallion als chemische Struktur eine stabile Wechselwirkung mit matrixgebundenen Chelatoren eingeht. 45

20. Verfahren nach 1. und 2., wobei die mit der Matrix interagierende chemische Funktion eine stabile hydrophobe Wechselwirkung eingeht. 50

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

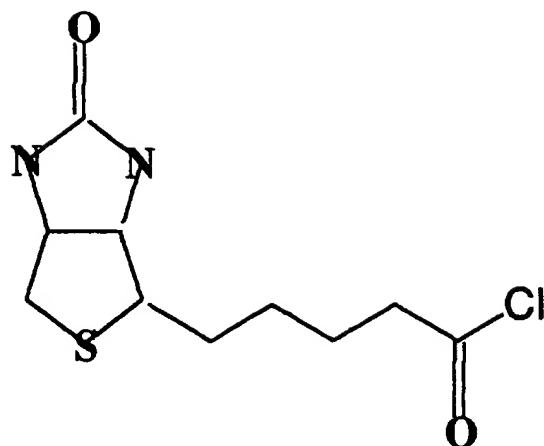


Fig.1. Exemplarische Darstellung eines bifunktionalen Reagens, das mittels der reaktiven Säurechloridfunktion mit hoher Effizienz die unreagierten, freien 5' bzw. 3' Hydroxygruppen in jedem Synthesezyklus maskiert und mit der Biotinfunktion markiert. Durch einen affinitätsvermittelten Trennungsschritt können dann nach Beendigung der Oligosynthese die unvollständigen Syntheseprodukte von den Syntheseprodukten voller Länge abgetrennt werden.

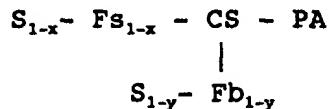


Fig.2. Formale Darstellung von Monomeren, die für eine sequenzdeterminierende, cyclische phosphoamiditbasierte Synthese in Frage kommen. CS ist eine beliebige chemische Struktur (z.B. Kohlenstoffgerüst mit Heteroatomen oder metallorganische Verbindungen) mit chemischen Funktionen ($F_{S_{1-x}}$, $F_{B_{1-y}}$) und deren Schutzgruppen (S_{1-x} , S_{1-y}). $F_{S_{1-x}}$ sind syntheserelevante chemische Funktionen, gegebenenfalls mit effizient und selektiv abspaltbaren Schutzgruppen (S_{1-x}). $F_{B_{1-y}}$ sind nicht syntheserelevante chemische Funktionen, und deren Schutzgruppen (S_{0-y}). PA ist eine synthesetaugliche Phosphoamiditfunktion. Z.B. ist die Verbindung riboAllyldeoxyUracilamidit eine solche Verbindung: $S_{x=1}$ = säurelabile Tritylschutzgruppe, $F_{S_{x=1}}$ = 5'-Hydroxylfunktion-, CS = 5-AllylUracil, $S_{y=1}$ = aminoständige Schutzgruppe, $F_{B_{y=1}}$ = Aminofunktion-, $S_{y=2}$ = basenstabile 2'-hydroxyständige Schutzgruppe, $F_{B_{y=2}}$ = 2'-Hydroxy-, PA = Phosphitamiditfunktion

Labelling and masking of incomplete products in the production of polymeric compounds, especially oligonucleotides, comprises the addition of reactive functional compounds during the synthesis

Veröffentlichungsnr. (Sek.) DE19935204
Veröffentlichungsdatum : 2001-02-01
Erfinder : PFLEIDERER WOLFGANG (DE)
Anmelder : BEMAUER ANNETTE (DE)
Veröffentlichungsnummer : DE19935204
Aktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991035204 19990727
Prioritätsaktenzeichen:
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19991035204 19990727
Klassifikationssymbol (IPC) : C07B51/00; C07B61/00; C07H21/00
Klassifikationssymbol (EC) : C07H21/00G
Korrespondierende Patentschriften

Bibliographische Daten

Bi- to oligo-functional compounds are added during the synthesis of optionally mixed polymers with a pre-determined sequence to mask and label incomplete products formed and to facilitate their removal. Masking and labelling of incomplete products in the synthesis of optionally mixed polymers with a pre-determined sequence comprises: (a) preparation of a matrix for a planned synthesis or an initiator molecule when the synthesis is performed in solution; (b) addition of a monomer containing selectively cleavable protecting group(s); (c) performance of at least one additional step required for the synthesis; (d) optional selective cleavage of protecting group(s); (e) addition of a monomer containing selectively cleavable protecting group (s); (f) addition of bi- to oligo-functional compound(s) which mask and label free unreacted groups in the product from (e) and optionally also from (a) and which enter into a stable interaction with the matrix or covalent bond with it; (g) performance of at least one additional step required for the synthesis; (h) optional interchange of steps (g) and (f); (i) optional repetition of steps (d) -(h) once or several times; (j) optional cleavage of the synthesized product from the matrix or initiator molecule and/or of protecting groups; (k) separation of the complete synthesized product from the incomplete masked and labelled incomplete product on a suitable matrix; and (l) optional selective cleavage of remaining protecting groups.

Daten aus der **esp@cenet** Datenbank - - I2